

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

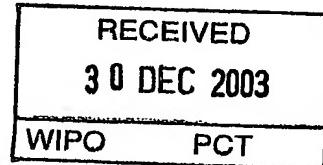
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年12月 6日

出願番号
Application Number: 特願 2002-356079

[ST. 10/C]: [JP 2002-356079]

出願人
Applicant(s): ペンタックス株式会社
小野一郎

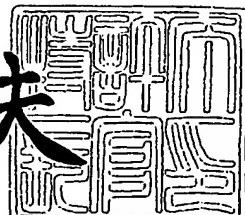


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 14P264

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町2丁目36番9号 ペンタックス株式会社内

【氏名】 中須 正議

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区前野町2丁目36番9号 ペンタックス株式会社内

【氏名】 松本 智勇

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市南区真駒内緑町3丁目4-2-406

【氏名】 小野 一郎

【特許出願人】

【識別番号】 000000527

【氏名又は名称】 ペンタックス株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501317906

【氏名又は名称】 小野 一郎

【代理人】

【識別番号】 100091292

【弁理士】

【氏名又は名称】 増田 達哉

【電話番号】 3595-3251

【選任した代理人】

【識別番号】 100091627

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝比 一夫

【電話番号】 3595-3251

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007593

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0104391

【包括委任状番号】 0112022

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨形成治療デバイス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨誘導因子と、隣接する空孔同士が連通する連続空孔を有する多孔質ブロック体で構成された基体とを含む骨形成治療デバイスであって、

前記基体の隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2] としたとき、B/Aが2～150なる関係を満足することを特徴とする骨形成治療デバイス。

【請求項 2】 前記骨誘導因子は、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸である請求項1に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 3】 前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種である請求項2に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 4】 前記核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含む請求項2または3に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 5】 前記核酸を、前記基体の体積1mLあたり1～100 μg となるよう用いる請求項2ないし4のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 6】 前記核酸を保持するベクターを含む請求項2ないし5のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 7】 前記ベクターは、非ウィルス由来のベクターである請求項6に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 8】 前記非ウィルス由来のベクターは、リポソームである請求項7に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 9】 前記リポソームは、正荷電リポソームである請求項8に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 10】 前記ベクターと前記核酸との配合比は、重量比で1：1～20：1である請求項6ないし9のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 11】 血管形成誘導因子を含む請求項1ないし10のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 12】 前記血管形成誘導因子は、繊維芽細胞増殖因子（FGF）

、血管内皮増殖因子（V E G F）、肝細胞増殖因子（H G F）のうちの少なくとも1種である請求項11に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項13】 前記血管形成誘導因子と前記骨誘導因子との配合比は、重量比で10：1～1：100である請求項11または12に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項14】 前記空孔の最大断面積（平均）Bは、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ である請求項1ないし13のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項15】 前記基体の空孔率は、30～95%である請求項1ないし14のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項16】 前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主としてなるものである請求項1ないし15のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、骨形成治療デバイスに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

医療の分野では、いわゆる人工骨、人工皮膚、人工臓器に対する研究が注目を集めしており、これらについて、既に臨床の現場でも種々の立場から新たな挑戦が行われており、ここ数年技術的にも多大な伸展を示している。

【0003】

特に、同種移植に関しては、需要が供給を大きく上回る状態が慢性的に持続していることに加え、未知の感染症などの問題もある。

【0004】

これらを回避するため、このような同種組織の移植に代わるものとして、人工的に製造した人工組織・人工臓器の開発が待望されている。この点に関しては、骨移植においても同様である。

【0005】

骨の形成過程、修復過程について、多くの研究者によって解明され、その制御の要となる骨誘導因子の発見・同定・分離に加え、遺伝子工学的手法での骨誘導因子の生成が可能となり、その作用機序についての知見も集積されている。

【0006】

この骨誘導因子としては、Transforming Growth Factor b (TGFb) の super family に属する骨形態形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) が多くの研究者の注目を集めている。このBMPは、皮下組織または筋組織内の未分化間葉系細胞に作用して、これを骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化させ、骨または軟骨を形成させる活性タンパク質であり、その基礎的検討が開始されている。

【0007】

例えば、特許文献1には、BMP自体またはBMPをコードするDNAを、マトリックス材料（基体）に担持（適用）した移植体材料が開示されている。

【0008】

このマトリックス材料は、通常、移植体材料を移植する骨欠損部等の移植部位の形状に対応して形成される。そして、移植部位では、マトリックス材料が骨形成の場となる。

【0009】

ここで、骨形成治療を早期に達成する観点からは、マトリックス材料の内部に優先的に骨形成が進行することが好ましい。

【0010】

しかしながら、従来の移植体材料では、マトリックス材料の内部に優先的に骨形成が進行するものとは言い難く、その内部形状（空孔形態）等によっては、マトリックス材料の外表面に優先的に骨形成が進行する場合がある。この場合、移植部位の形状から大きく逸脱して骨形成がなされることになり好ましくない。

【0011】**【特許文献1】**

特表2001-505097号公報

【0012】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供することにある。

【0013】**【課題を解決するための手段】**

このような目的は、下記（1）～（16）の本発明により達成される。

【0014】

（1）骨誘導因子と、隣接する空孔同士が連通する連続空孔を有する多孔質ブロック体で構成された基体とを含む骨形成治療デバイスであって、

前記基体の隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2] としたとき、B/Aが2～150なる関係を満足することを特徴とする骨形成治療デバイス。

【0015】

本発明によれば、優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供することができる。

【0016】

（2）前記骨誘導因子は、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸である上記（1）に記載の骨形成治療デバイス。

これにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

【0017】

（3）前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種である上記（2）に記載の骨形成治療デバイス。

【0018】

BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れる。

【0019】

（4）前記核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含む上記（2）または（3）に記載の骨形成治療デバイス。

【0020】

これにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関する細胞内におけるBMPの発現効率を、極めて高くすることができる。

【0021】

(5) 前記核酸を、前記基体の体積1mLあたり1～100μgとなるよう用いる上記(2)ないし(4)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

これにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

【0022】

(6) 前記核酸を保持するベクターを含む上記(2)ないし(5)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0023】

これにより、骨形成に関する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率がより向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。

【0024】

(7) 前記ベクターは、非ウィルス由来のベクターである上記(6)に記載の骨形成治療デバイス。

【0025】

これにより、限局した部位に比較的大量の核酸を、容易かつ確実に供給することができ、また、患者のより高い安全性を確保することができる。

【0026】

(8) 前記非ウィルス由来のベクターは、リポソームである上記(7)に記載の骨形成治療デバイス。

【0027】

リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結合（融合）が比較的容易かつ円滑になされ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関する細胞への取り込みの効率をより向上させることができる。

【0028】

(9) 前記リポソームは、正荷電リポソームである上記(8)に記載の骨形

成治療デバイス。

【0029】

正荷電リポソームは、その内部に核酸を封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

【0030】

(10) 前記ベクターと前記核酸との配合比は、重量比で1：1～20：1である上記(6)ないし(9)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0031】

これにより、コストの増大や細胞毒性の発生を防止しつつ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができる。

【0032】

(11) 血管形成誘導因子を含む上記(1)ないし(10)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

これにより、より迅速な骨形成が促される。

【0033】

(12) 前記血管形成誘導因子は、繊維芽細胞増殖因子(FGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)のうちの少なくとも1種である上記(11)に記載の骨形成治療デバイス。

【0034】

これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

【0035】

(13) 前記血管形成誘導因子と前記骨誘導因子との配合比は、重量比で10：1～1：100である上記(11)または(12)に記載の骨形成治療デバイス。

【0036】

これにより、新生血管が効率よく形成されるとともに、骨芽細胞が効率よく増殖することができる。

【0037】

(14) 前記空孔の最大断面積(平均)Bは、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ である上記(1)ないし(13)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0038】

これにより、効果的な骨伝導性を得ることができる。すなわち、骨欠損部に埋入された基体の空孔内に連続的な骨形成が可能になる。

【0039】

(15) 前記基体の空孔率は、30～95%である上記(1)ないし(14)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0040】

これにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、基体をより好適な骨形成の場とすることができます。

【0041】

(16) 前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主としてなるものである上記(1)ないし(15)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0042】

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様(近似)の組成、構造、物性を有するため、特に優れた生体適合性を有している。

【0043】**【発明の実施の形態】**

以下、本発明の骨形成治療デバイスについて詳細に説明する。

【0044】

本発明の骨形成治療デバイスは、骨誘導因子と、基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。

【0045】

ここで、本明細書中における「骨形成」とは、骨形成および軟骨形成の双方を含み、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞や軟骨芽細胞(以下、骨芽細胞で代表

する) の分化を誘導することによる骨形成や軟骨形成のことを言う。

【0046】

また、「骨形成治療」とは、医科領域および歯科領域において、骨組織や軟骨組織の形成や補填を要する疾患の予防や治療を行うこと、あるいは、症状を改善させることを言う。

【0047】

なお、以下の説明では、骨誘導因子として、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸を代表に説明する。骨誘導因子として、BMPをコードする塩基配列を含む核酸を用いることにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

【0048】

また、BMPをコードする塩基配列としては、通常、cDNAが用いられるため、以下では、BMPをコードする塩基配列を、「BMP cDNA」と言う。

【0049】

本発明におけるBMPとしては、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞への分化を誘導することにより骨形成を促す活性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-12（以上、ホモダイマー）、もしくは、これらのBMPのヘテロダイマーまたは改変体（すなわち、天然に存在するBMPのアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が消失、置換および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、天然に存在するBMPと同じ活性を有するタンパク質）等が挙げられる。これらの中でも、BMPとしては、特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種が好ましい。BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に高い骨形成能を示す。

【0050】

このようなことから、本発明で用いるBMP cDNAとしては、前述のような各種BMPを産生（発現）し得る塩基配列を含むものであればよい。すなわち

、BMP cDNAとしては、天然に存在するBMPをコードする塩基配列と同一、または、天然に存在するBMPをコードする塩基配列において1以上の塩基が欠失、置換および／または付加されたものを用いることができる。また、これらのものは、1種または2種以上を組み合わせて用いるようにしてもよい。

【0051】

このようなBMP cDNAは、例えば、特表平2-500241号公報、特表平3-503649号公報、特表平3-505098号公報等に記載の方法に従って、入手することができる。

【0052】

また、このような核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含むもの、すなわち、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだ（導入した）ものであるのが好ましい。

【0053】

以下では、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだものを、「組換えプラスミド」と言い、この組換えプラスミドを、BMP cDNAをコードする塩基配列を含む核酸の代表として説明する。

【0054】

このような組換えプラスミドを用いることにより、これを取り込んだ未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞等（以下、これらを総称して、「骨形成に関与する細胞」と言う。）内におけるBMPの発現効率を、極めて高くすることができる。

【0055】

発現プラスミドには、遺伝子組換え工学技術の分野で広く用いられるものの中から選択することができ、例えば、pCAH、pSC101、pBR322、pUC18等の1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

【0056】

また、この組換えプラスミドには、適宜、BMPの発現を適切に制御する塩基配列（DNA断片）を導入することができる。

【0057】

発現プラスミドに、BMP-cDNAを含む各種の塩基配列を組み込む方法には、公知の方法を用いることができる。

【0058】

ここで、図1に、組換えプラスミド（キメラDNA）の一例を示す。

図1に示す組換えプラスミドは、BMP-2 cDNAを、発現プラスミドであるpCAHに導入したものである。

【0059】

この組換えプラスミドは、Amp（アンピシリン）に耐性を示すDNA断片を含むとともに、サイトメガロウィルス（CMV）由来のエンハンサー・プロモーターを含むDNA断片と、BMP-2 cDNAの下流域には、SV40由来の転写終結信号を含むDNA断片とが組み込まれている。

【0060】

用いる組換えプラスミド（核酸）の量は、特に限定されないが、後述する基体の体積1mLあたり1～100μg程度であるのが好ましく、10～70μg程度であるのがより好ましい。用いる組換えプラスミドの量が少な過ぎると、迅速な骨形成を促すことができない場合がある。一方、用いる組換えプラスミドの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

【0061】

また、本発明の骨形成治療デバイスは、多孔質ブロック体（例えば、焼結体）で構成された基体を有している。この基体は、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞による骨形成の場（フィールド）となる。

【0062】

この多孔質ブロック体は、隣接する空孔同士が閉鎖された閉鎖空孔ではなく、互いに連通する連続空孔を有するものである。

【0063】

図2は、本発明における基体の縦断面を示す模式図であり、図3は、参考例の基体の縦断面を示す模式図である。図2および図3中の符号「2」は、新生骨を示す。

【0064】

本発明の骨形成治療デバイスは、基体1の隣接する空孔1a同士の境界部の面積（平均）を、空孔の最大断面積（平均）に対して適度な大きさに設定したことに特徴を有している。具体的には、図2に示すように、基体1の隣接する空孔1a同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2]としたとき、B/Aが2～150なる関係を満足するもの、好ましくは2.5～125なる関係を満足するもの、より好ましくは3.0～100なる関係を満足するものとした。

【0065】

B/Aが前記下限値未満の場合、すなわち、図3に示すように、隣接する空孔10a同士の境界部の面積（平均）が空孔の最大断面積（平均）に比較して比較的大きい基体10の場合、骨形成に関与する細胞は、基体10の内面に沿って空孔10aから隣接する空孔10aへ速やかに移動して、基体10の外表面10bに到達するので、新生骨2は、基体10の内部および基体10の外表面10bでほぼ同時、あるいは、基体10の外表面10bにおいて優先して形成されることになる。

【0066】

一方、B/Aが前記上限値を超える場合、すなわち、図示しないが、隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）が空孔の最大断面積（平均）に比較して極めて小さい基体の場合、骨形成に関与する細胞は、基体の内部に侵入することが困難となり、新生骨は、基体の外表面で優先して形成されることになる。

【0067】

これに対し、本発明では、B/Aを前記範囲に設定したことにより、骨形成に関与する細胞は、空孔1aを十分に満した後、逸脱（逸流）して、隣接する空孔1aへ移動（拡散）するようになるため、図2に示すように、基体1内部において、多くの新生骨2が形成されることになる。このようなことから、本発明の骨形成治療デバイスによれば、基体1の形状、すなわち、例えば骨欠損部等の移植部位の形状に対応した骨形成が可能となる。その結果、本発明によれば、早期の骨形成治療に貢献することができる。

【0068】

具体的に、前記空孔の最大断面積（平均）Bは、 $7.9 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 程度であるのが好ましく、 $1.8 \times 10^4 \sim 7.9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 程度であるのがより好ましい。なお、この空孔の最大断面積（平均）Bを平均空孔径に換算した場合、その値は、 $100 \sim 1200 \mu\text{m}$ （好ましくは $150 \sim 1000 \mu\text{m}$ ）となる。空孔の最大断面積（平均）Bを前記範囲とすることにより、基体が骨形成因子等による急速な骨形成を阻害せず、空孔（気孔）内へ骨進入させることができることになる。

【0069】

また、基体の空孔率は、特に限定されないが、 $30 \sim 95\%$ 程度であるのが好ましく、 $55 \sim 90\%$ 程度であるのがより好ましい。空孔率を前記範囲とすることにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、基体をより好適な骨形成の場とすることができます。

【0070】

また、基体の構成材料としては、生体適合性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウムのようなリン酸カルシウム系化合物、アルミナ、チタニア、ジルコニア、イットリア等のセラミックス材料、チタンまたはチタン合金、ステンレス鋼、Co-Cr系合金、Ni-Ti系合金等の各種金属材料等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。

【0071】

これらの中でも、基体の構成材料としては、リン酸カルシウム系化合物、アルミナ、ジルコニア等のセラミックス材料（いわゆる、バイオセラミックス）が好ましく、特に、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主材料とするものが好ましい。

【0072】

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様（近似）の組成、構造、特性を有するため、特に優れた生体適合性を有している。また、正負両荷電を有しているため、特に、ベクターとしてリポソームを用いる

場合（この点については、後に詳述する）には、このリポソームを基体に長時間、安定的に担持させることができる。その結果、リポソームに吸着または封入された組換えプラスミド（核酸）も基体に長時間、安定的に保持されることになり、より迅速な骨形成に寄与する。また、骨芽細胞との親和性も高いことから新生骨を維持する上でも好ましい。

【0073】

このような基体は、種々の方法により作製（製造）することができる。基体として、セラミックス材料で構成される多孔質ブロック体を作製する場合を一例に説明すると、このような多孔質ブロック体は、例えば、水溶性高分子を含むセラミックススラリーを攪拌起泡後に乾燥させ多孔質ブロックにし、骨欠損部等の移植部位に対応した形状に、例えばマシニングセンター等の汎用加工機械により成形体を得、かかる成形体を焼結（焼成）することによって作製することができる。

【0074】

このような基体の製造方法において、例えば、原料粉体合成の条件（1次粒子径、1次粒子分散状態等）、原料粉体の条件（平均粒径、仮焼成の有無、粉碎処理の有無等）、攪拌起泡の条件（界面活性剤の種類、スラリーを攪拌する攪拌力等）、焼成条件（焼成雰囲気、焼成温度等）等を適宜設定することにより、前記B/Aの値を所望のものに設定することができる。例えば、焼成温度を高くすると、原料粉体同士の間で拡散が促進され、Aの値が小さくなり、B/Aの値が大きくなる傾向を示す。

【0075】

特に、原料粉体の条件、攪拌起泡の条件等は、B/Aの値に大きく影響を与えるため、これらの条件の管理は、より厳密に行うのが好ましい。

【0076】

なお、目的とするB/Aの値を得るための各種条件は、実験的に求めることができる。

【0077】

以上のような骨形成治療デバイスは、組換えプラスミド（核酸）を基体に接触

させることにより作製（製造）することができる。具体的には、骨形成治療デバイスは、例えば、組換えプラスミドを含む液体（溶液または懸濁液）を基体に供給すること、あるいは、この液体に基体を浸漬すること等により、容易に作製することができる。

【0078】

また、例えば、粉末状、顆粒状、ペレット状等の基体の前駆体とバインダーと前述したような液体とを混練した混練物を、成形することにより骨形成治療デバイスを作製することもできる。

【0079】

このような骨形成治療デバイスを、例えば骨欠損部等の移植部位に埋設（適用）すると、この骨形成治療デバイスの近傍に存在する骨形成に関与する細胞が、その細胞内に組換えプラスミド（核酸）を取り込む。これらの細胞内では、組換えプラスミドを鋳型として順次BMPが産生され、このBMPにより、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化が誘導され、その結果、骨形成が進行する。なお、この骨形成は、基体の外表面から内部に向かって、基体の形状に対応して（移植部位の形状に対応して）、迅速に進行する。

【0080】

また、このような骨形成治療デバイスは、ベクターや血管形成誘導因子を含むのが好ましい。骨形成治療デバイスが、これらのものを含むことにより、より迅速な骨形成が促される。なお、骨形成治療デバイスは、いずれか一方を含むのが好ましく、双方を含むのがより好ましい。

【0081】

以下、ベクターおよび血管形成誘導因子について、それぞれ、詳細に説明する。

【0082】

ベクターは、組換えプラスミド（核酸）を保持し、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みを促進する機能を有するものである。ベクターを用いることにより、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率がより向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。

【0083】

ベクターとしては、ウイルス由来でないベクター（すなわち、非ウイルス由来のベクター）、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターのようなウイルス由来のベクターのいずれを用いてもよいが、非ウイルス由来のベクターを用いるのが好ましい。非ウイルス由来のベクターを用いることにより、限局した部位に比較的大量の組換えプラスミドを、容易かつ確実に供給することができ、また、感染を起こさないことから患者のより高い安全性を確保することができるという利点もある。さらに、非ウイルス由来のベクターを用いる方法は、ウイルスベクターや細胞を用いる *e x v i v o* 等の方法では、ウイルスベクターや細胞への核酸の導入操作、核酸を導入したウイルスベクターや細胞を増殖させる操作等が必要であるのに対し、これらの操作を必要としないことから、時間と手間とを低減できるという点においても優れている。

【0084】

非ウイルス由来のベクターとしては、種々のものを用いることができるが、リポソーム（脂質膜）を用いるのが好適である。リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結合（融合）が比較的容易かつ円滑になされる。このため、組換えプラスミドの骨形成に関与する細胞への取り込みの効率をより向上させることができる。

【0085】

リポソームとしては、例えば、表面に組換えプラスミドを吸着する形態の正荷電リポソーム、内部に組換えプラスミドを封入する形態の負荷電リポソーム等を用いることができる。これらのリポソームは、単独または組み合わせて用いることもできる。

【0086】

正荷電リポソームは、例えば、D O S P A (2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate) のようなポリカチオン性脂質を主としてなるものである。なお、正荷電リポソームとしては、例えば、Q I A G E N 社製の「S u p e r F e c t」等の市販品を用いることができる。

【0087】

一方、負荷電リポソームは、例えば、3-sn-ホスファチジルコリン、3-sn-ホスファチジルセリン、3-sn-ホスファチジルエタノールアミン、3-sn-ホスファチダルエタノールアミン、または、これらの誘導体のようなリン脂質を主としてなるものである。

【0088】

また、これらのリポソームには、例えばコレステロール等の脂質膜を安定化する添加剤を添加するようにしてもよい。

【0089】

なお、リポソームとしては、特に、正荷電リポソームを用いるのが好ましい。正荷電リポソームは、その内部に組換えプラスミドを封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

【0090】

用いるベクターの量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、ベクターと組換えプラスミド（核酸）との配合比が、重量比で1：1～20：1程度であるのが好ましく、2：1～10：1程度であるのがより好ましい。用いるベクターの量が少な過ぎると、ベクターの種類等によっては、組換えプラスミドの骨形成に関与する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができない場合がある。一方、用いるベクターの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めないばかりでなく、細胞毒性が生じる場合がある。また、コストの増大を招き好ましくない。

【0091】

血管形成誘導因子は、血管形成に関する細胞（例えば、血管皮内細胞等）に作用して、新生血管の形成を促進するものである。この血管形成誘導因子を用いることにより、基体の内部（空孔内）に、すなわち、骨芽細胞の周囲に新生血管が形成される。これにより、細胞の構築（形成）に必要な各種基質が骨芽細胞に供給されるので、骨芽細胞は、効率よく増殖することができる。その結果、骨形成をより促進することができる。

【0092】

本発明における血管形成誘導因子としては、血管形成を促進し得るものであればよく、特に限定されないが、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor : bFGF）、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF）、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor : HGF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor : GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte-Colony Stimulating Factor : G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（Macrophage-Colony Stimulating Factor : M-CSF）、幹細胞因子（Stem Cell Factor : SCF）、アンジオポエチン-1（Angiopoietin-1）、アンジオポエチン-2（Angiopoietin-2）、リボヌクレアーゼ類似タンパク質、ニコチニアミド、プロスタグラジンE（プロスタグラジンE₁、プロスタグラジンE₂、プロスタグラジンE₃）、プロリン誘導体、ディブチルサイクリックAMP（d_BcAMP）のようなサイクリックAMP誘導体等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。これらの中でも、血管形成誘導因子としては、特に、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）のうちの少なくとも1種であるのが好ましい。これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

【0093】

用いる血管形成誘導因子の量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、血管形成誘導因子と組換えプラスミド（核酸）との配合比が、重量比で10:1～1:100程度であるのが好ましく、1:1～1:100程度であるのがより好ましい。用いる血管形成誘導因子の量が少な過ぎると、血管形成誘導因子の種類等によっては、新生血管が効率よく形成されず、骨芽細胞が十分に増殖できない場合がある。一方、用いる血管形成誘導因子の量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

【0094】

以上、本発明の骨形成治療デバイスの好適な実施形態について説明したが、本発明は、これに限定されるものではない。

【0095】

前記実施形態では、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸として、BMP cDNAを発現プラスミドに組み込んだ組換えプラスミドを代表に説明したが、本発明におけるBMPをコードする塩基配列を含む核酸としては、例えば、BMP cDNA（発現プラスミドに組み込まないもの）、BMPのmRNA、あるいは、これらに任意の塩基を付加したもの等であってもよい。

【0096】

また、骨誘導因子として、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸を代表に説明したが、本発明における骨誘導因子としては、前述したようなBMP自体等が挙げられる。

【0097】**【実施例】**

次に、本発明の具体的実施例について説明する。

【0098】**(実施例1)****1. 組換えプラスミドの調製**

公知の方法により、ヒトBMP-2 cDNA（ヒトBMP-2をコードする塩基配列）と、所望の塩基配列とを、発現プラスミドに組み込んで、図1に示すような組換えプラスミドを得た。

そして、この組換えプラスミドを、次のようにして増殖させた。

【0099】

まず、室温で、組換えプラスミドを、DH5 α (Competent Bacteriā) の懸濁液200 μ Lに添加した。

【0100】

次に、この混合液をLB寒天培地に添加して、37℃×12時間、培養した。

次に、この培養終了後、LB寒天培地に増殖したコロニーの中から比較的大きいコロニーを選択し、これをAmp（アンピシリン）を含むLB寒天培地に移植し、さらに37℃×12時間、培養した。

【0101】

その後、Ampを含むLB寒天培地で増殖したDH5 α の細胞膜を破壊し、その溶液から、組換えプラスミドを精製分離した。

【0102】**2. ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）の製造**

公知の湿式合成法によりハイドロキシアパタイトを合成し、ハイドロキシアパタイトスラリーを得た。

【0103】

このハイドロキシアパタイトスラリーを噴霧乾燥して平均粒径15 μm 程度の粉体を得た。その後、この粉体を700℃×2時間、仮焼成した後、汎用粉碎装置を使用し、平均粒径12 μm 程度に粉碎した。粉碎したハイドロキシアパタイト粉体を、1%メチルセルロース（水溶性高分子）水溶液に混合した後、攪拌して、気泡を含有するペースト状混合物を得た。なお、ハイドロキシアパタイト粉体とメチルセルロース水溶液とは、重量比5：6で混合した。

【0104】

このペースト状混練物を型に入れて、水溶性高分子をゲル化させるため80℃で乾燥し、成形体を製造した。成形体を汎用旋盤等の加工機械を使用し直径10mm×厚さ3mm（体積：約0.24mL）の円盤状に加工した。

【0105】

この円盤状成形体を1200℃、大気中で2時間焼成し、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得た。

【0106】

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体は、空孔率70%であった。この測定は、アルキメデス法により行った。また、前記B/Aは、約100であった。

【0107】

図4には、このハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真を示した。

【0108】

3. 骨形成治療デバイスの作製

組換えプラスミドを含有するリン酸緩衝液と、血管形成誘導因子である塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含有するリン酸緩衝液と、ベクターである正荷電リポソーム（QIAGEN社製、「Superfect」）を含有するリン酸緩衝液とを用意し、組換えプラスミドが $10\text{ }\mu\text{g}$ 、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF） $1\text{ }\mu\text{g}$ 、正荷電リポソームが $40\text{ }\mu\text{g}$ となるように、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に含浸させた。

これにより、骨形成治療デバイスを得た。

【0109】

(実施例2)

前記実施例1と同様のハイドロキシアパタイト粉体と、非イオン性界面活性剤であるN,N-ジメチルドデシルアミノキサイド（ライオン（株）製、「AROMOX」）とを、1%メチルセルロース（水溶性高分子）水溶液に混合した後、前記実施例1より激しく攪拌して、気泡を含有するペースト状混合物を得た。なお、N,N-ジメチルドデシルアミノキサイドは、ペースト状混合物中に、2wt%となるよう添加した。

【0110】

かかるペースト状混合物を用いて、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）を製造した以外は、前記実施例1と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

【0111】

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）は、B/Aが約3、かつ、空孔率が85%であった。

【0112】

図5には、このハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真を示した。

【0113】

(比較例1)

ペースト状混合物を得る際に、窒素ガスを吹き込みながら攪拌した以外は、前

記実施例2と同様にして、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得、骨形成治療デバイスを作製した。

【0114】

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）は、B/Aが約1、かつ、空孔率が95%であった。

【0115】

（比較例2）

前記実施例1と同様のハイドロキシアパタイト粉体を水に懸濁したスラリーを用いて、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）を製造した以外は、前記実施例1と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

【0116】

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体（基体）は、B/Aが約160、かつ、空孔率が30%であった。

【0117】

<評価>

1. 評価実験

24羽の家兎（平均体重3.0kg）を用意した。各家兎には、それぞれ、次のような手術を施した。

【0118】

まず、家兎に対して、25mg/kgペントバルビタールナトリウム（アボットラボラトリ－社製、「ネンブタール」）を静脈内投与することにより麻酔した。

【0119】

次に、家兎の頭皮に切開を入れ、尾側を茎とする幅2.5cm×長さ3.0cmの皮弁として挙上した。

【0120】

次に、露出した骨膜に2～3mmの切開を入れ、かかる部分に骨膜剥離子を当てて、直径約3mmの部分を剥離して頭蓋骨を露出させた。

【0121】

次に、露出した頭蓋骨の正中付近を、頭蓋骨穿頭器を用いて開頭し、硬膜は温存するように、その直上まで頭蓋骨を除去した後、完全に止血した。なお、頭蓋骨の厚さは約3mmであり、開頭部分の直径は約1.2cmとした。

【0122】

次に、開頭を行った家兎を6羽ずつの計4群に分け、第1群の各家兎には、それぞれ、実施例1の骨形成治療デバイスを、第2群の各家兎には、それぞれ、実施例2の骨形成治療デバイスを、第3群の各家兎には、それぞれ、比較例1の骨形成治療デバイスを、また、第4群の各家兎には、それぞれ、比較例2の骨形成治療デバイスを移植した後、皮弁を元の位置へ戻して縫合した。

【0123】

そして、手術が行われた各家兎を、それぞれ、個別のケージに入れて飼育した。

【0124】

2. 評価結果

手術後9週目に全ての家兎を、前記同様の麻酔薬を過量投与することにより屠殺した。

【0125】

その後、頭蓋骨を直上の皮膚とともに一塊として切除し、採取した組織を直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した後、ポリエチル樹脂に埋入した。次に、このポリエチル樹脂に埋入した組織を、厚さ50μmとなるように薄切研磨した後、cole-HE染色を行った。これにより、組織標本を得た。

【0126】

得られた各組織標本について、それぞれ、次のようにして骨形成率を測定した。すなわち、各組織標本を、それぞれ、デジタルカメラ(DP-12)付き実体顕微鏡システムSZX-12(オリンパス社製)で撮影した。次に、photo shop_ver4.0(アドビ社製)を使用し、撮影した画像データから新生骨部分をデジタル処理により抽出し、さらにSCIONイメージ(SCION社製)を用いて、画像解析の手法により前記抽出された新生骨部分の面積を計測数値化して骨形成率を求めた。

【0127】

なお、骨形成率の測定は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の面方向（厚さ方向に垂直な方向）の端部から $5\text{ mm} \times$ （ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の厚さ 3 mm +硬膜側へ 2 mm の部分）の範囲について行った。また、骨形成率は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の内部および外表面のそれぞれについて求めた。

この結果を表1に示す。

【0128】

【表1】

表1

	骨形成治療デバイス		評価結果	
	HAp多孔質焼結体		骨形成率 (%)	
	B/A	空孔率 (%)	内部	外表面
実施例1	100	70	42±10.5	25±13.1
実施例2	3	85	40±10.5	14±12.1
比較例1	1	95	10±10.3	40±10.4
比較例2	160	30	24±12.4	33±11.8

HAp : ハイドロキシアパタイト

【0129】

表1に示すように、実施例1および実施例2の骨形成治療デバイスでは、いずれも、基体の外表面よりも内部での迅速な骨形成が認められた。

【0130】

これに対し、比較例1および比較例2の骨形成治療デバイスでは、いずれも、基体の内部に比較して外表面での骨形成が有意であった。

【0131】

このように、基体の内部形状（空孔形態）を好適なものに設定することにより

、基体の形状（移植部位の形状）に対応した骨形成が可能となることが明らかとなつた。

【0132】

また、基体として、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に代わり、リン酸三カルシウム多孔質焼結体を用いて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0133】

また、骨誘導因子として、各種ヒトBMP、各種ヒトBMPをコードする塩基配列を含む核酸、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0134】

また、血管形成誘導因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）に代わり、血管内皮増殖因子（VEGF）または肝細胞増殖因子（HGF）、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0135】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、極めて迅速かつ、移植部位の形状に対応した骨形成を可能とし、早期の骨形成治療に貢献することができる。

【0136】

このため、各種骨形成治療に際し、遊離骨移植を行う必要がなくなり、採骨部が不要となることから、より安全かつ確実で、合理的な手術が可能となる。

【0137】

このようなことから、手術時間や入院期間の短縮を図ることができ、トータルの医療コストの削減、治療クオリティーの向上、患者のQOLの向上を図ることができる。

【0138】

また、血管形成誘導因子を併用することにより、骨芽細胞の周囲に新生血管が

活性に形成され、骨芽細胞が効率よく増殖して、その結果、より迅速な骨形成がなされる。

【0139】

また、核酸を保持するベクターを併用することにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関する細胞内への核酸の取り込みの効率が向上して、結果として、より迅速な骨形成がなされる。

【0140】

また、本発明の骨形成治療デバイスは、保存、取扱いや手術時の加工等が容易である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

組換えプラスミドの一例を示す遺伝子地図である。

【図2】

本発明における基体の縦断面を示す模式図である。

【図3】

参考例の基体の縦断面を示す模式図である。

【図4】

実施例1のハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真である。

【図5】

実施例2のハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の外表面を50倍に拡大した電子顕微鏡写真である。

【符号の説明】

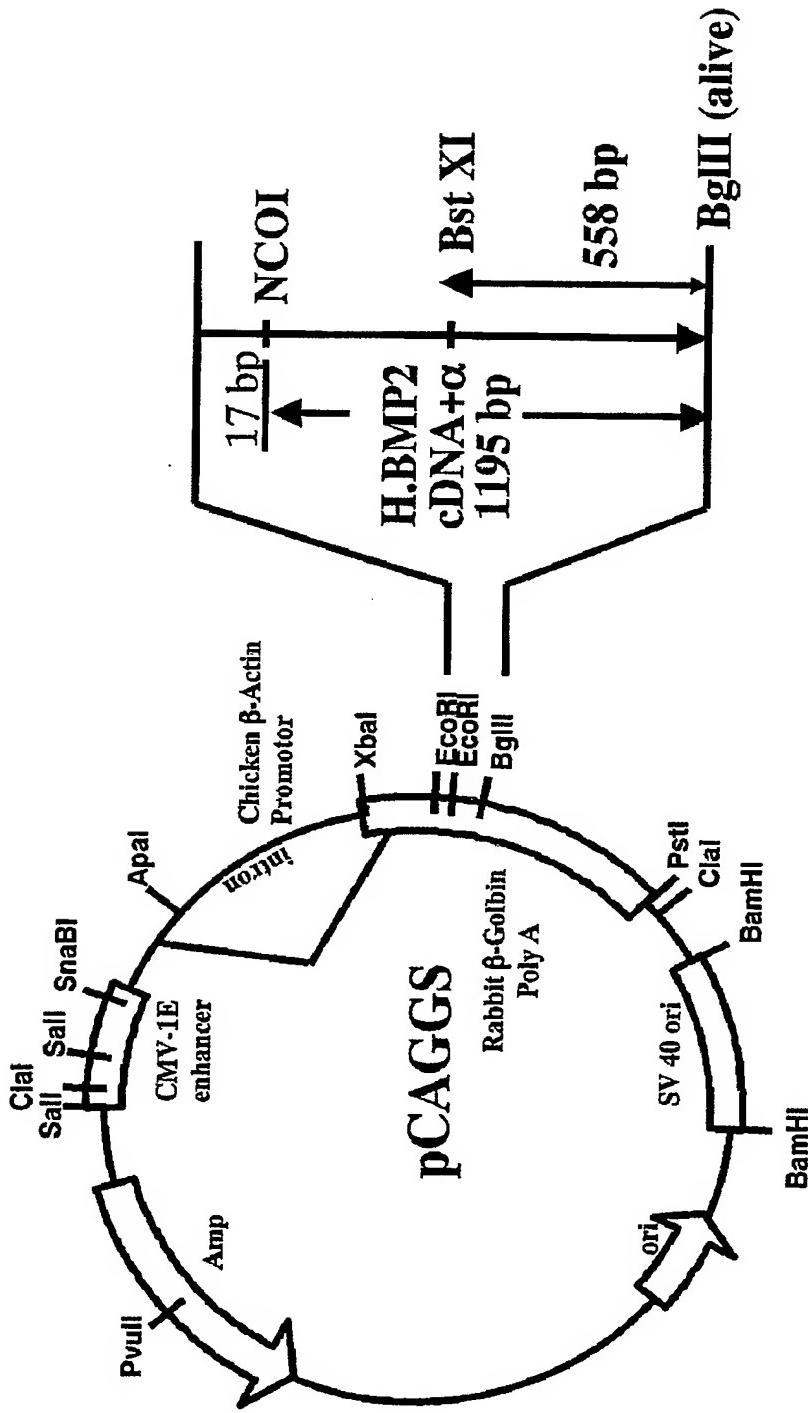
- 1、10 基体
- 1a、10a 空孔
- 1b、10b 外表面
- 2 新生骨

【書類名】

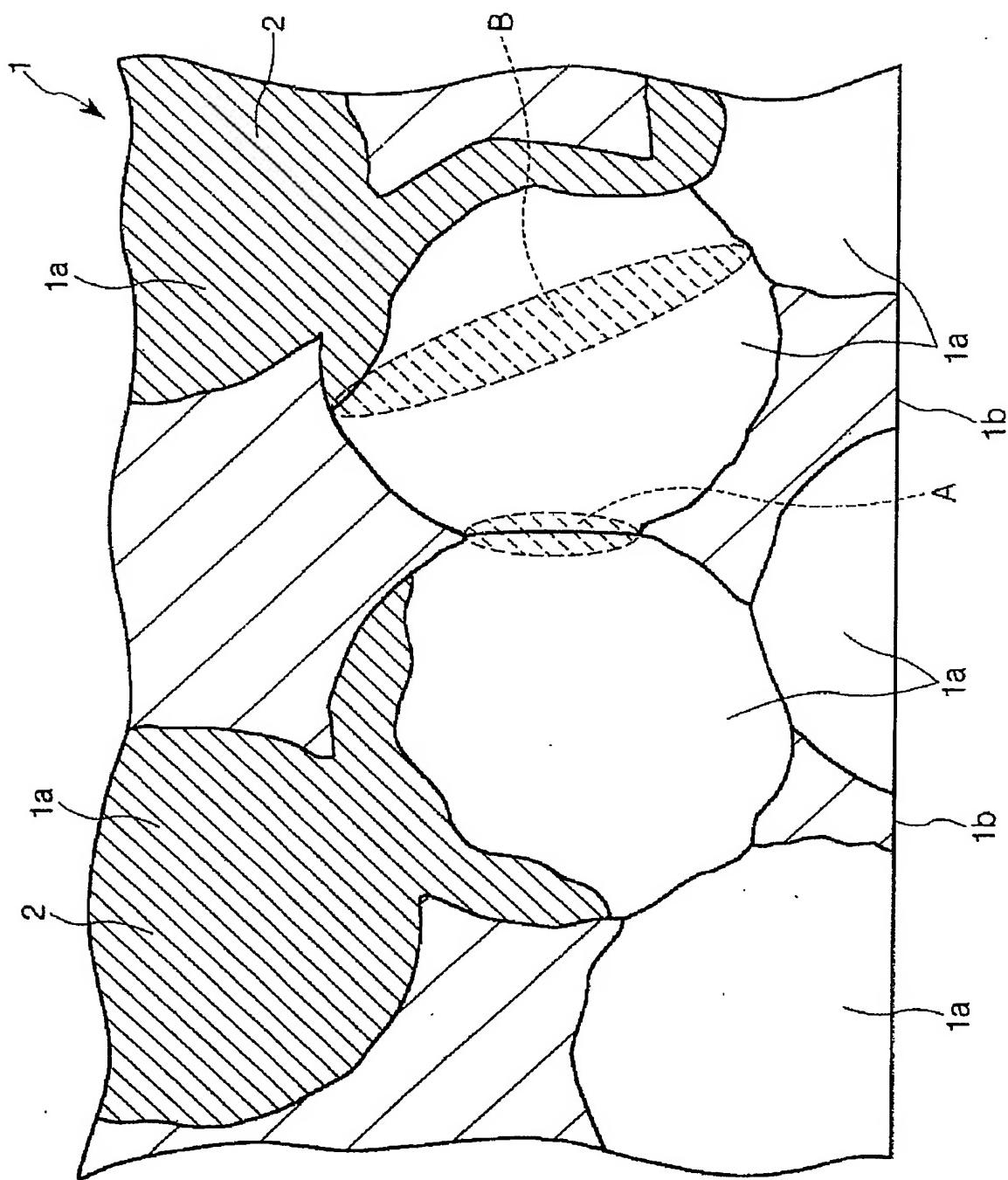
図面

【図1】

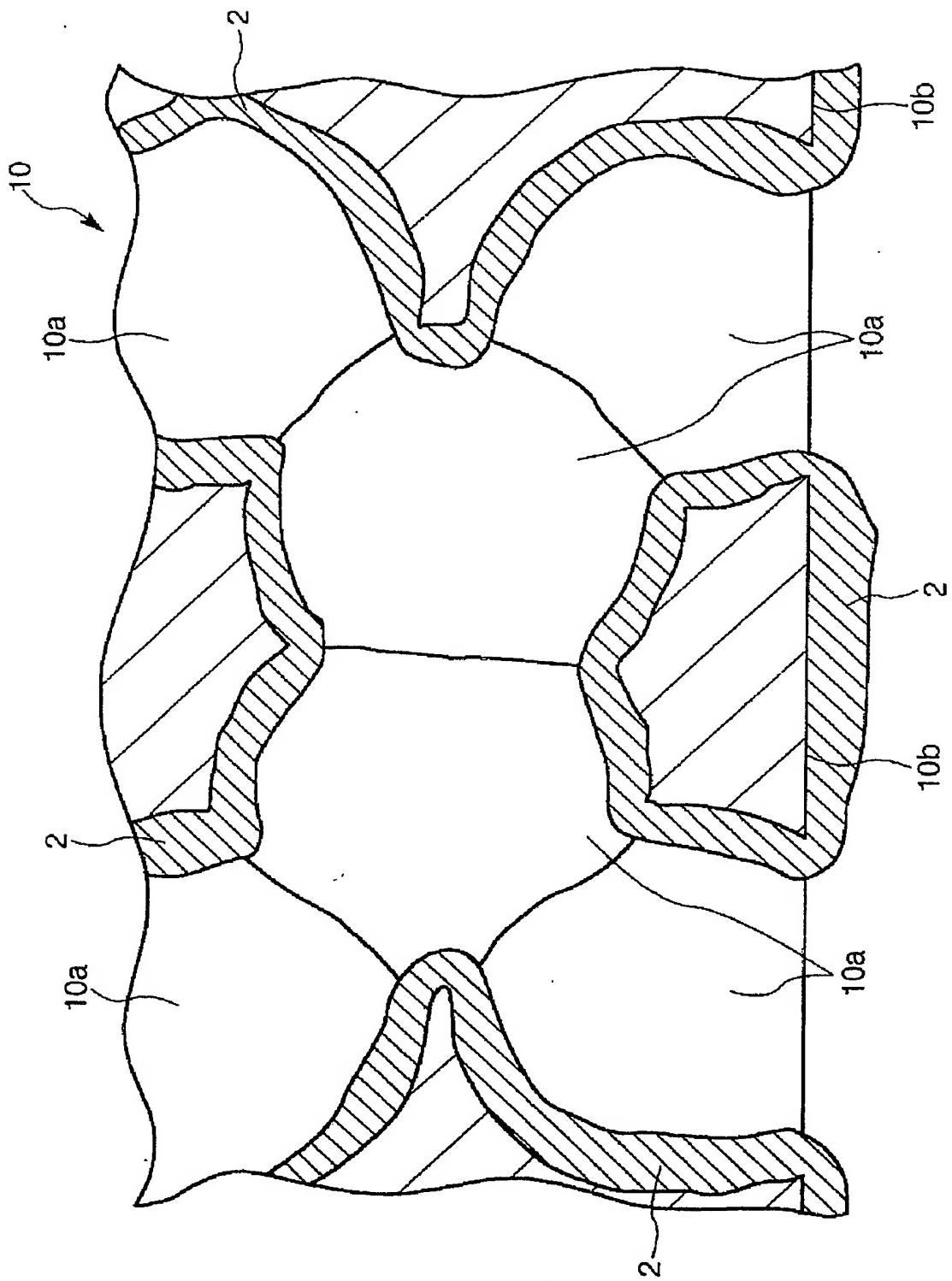
pCAH.BMP2 (5910 bp)



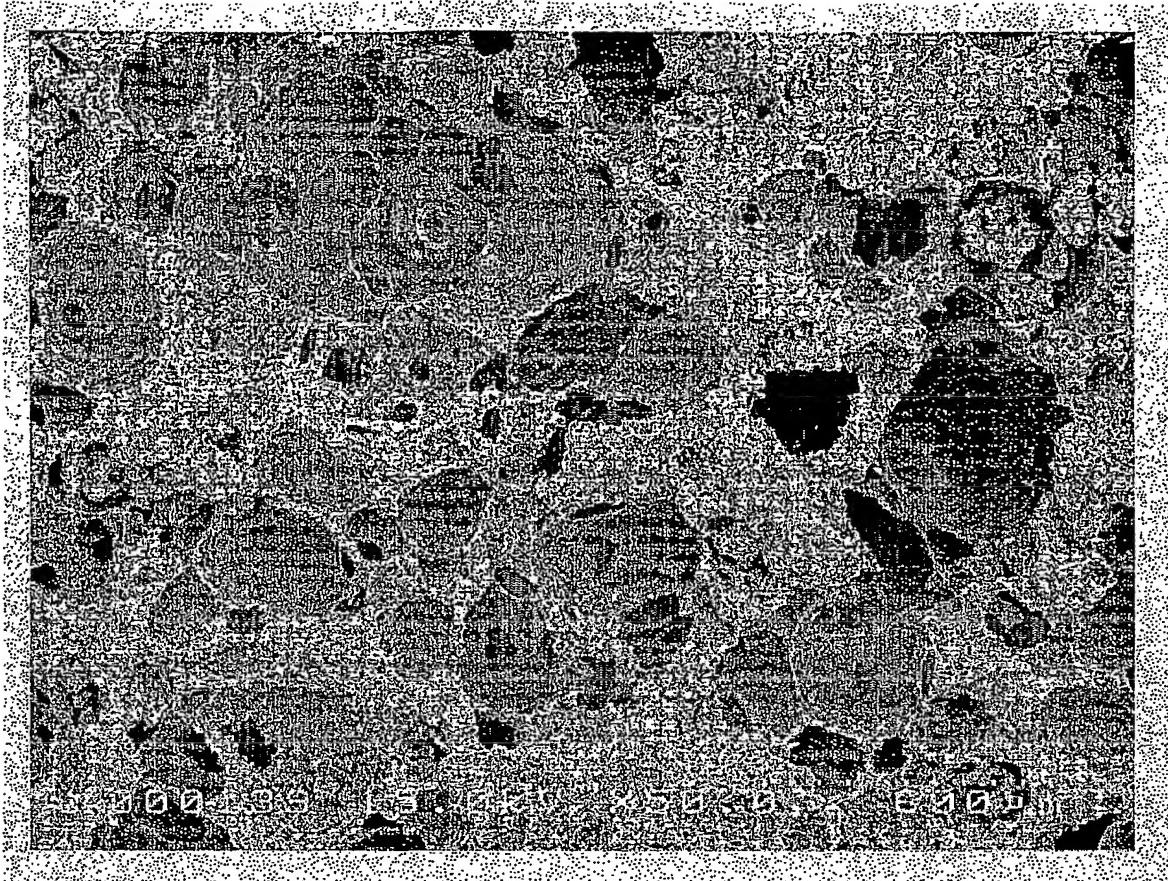
【図2】



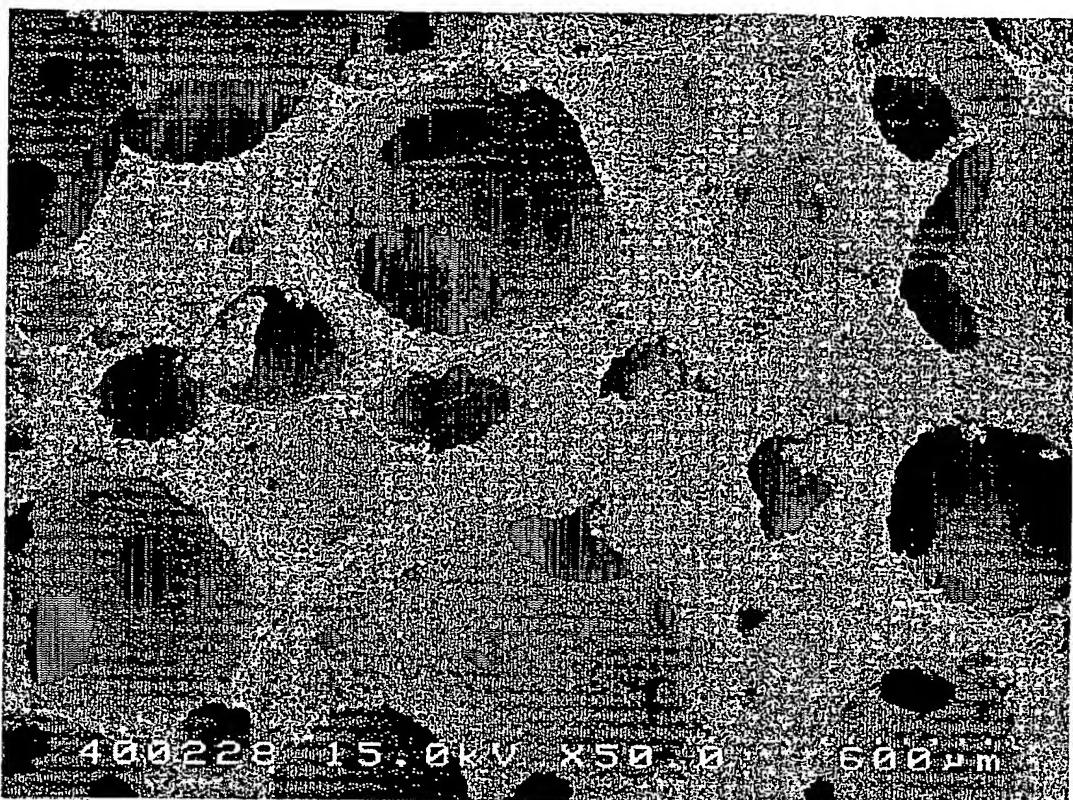
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 優れた骨形成能を有し、移植部位の形状に対応した骨形成が可能な骨形成治療デバイスを提供すること。

【解決手段】 本発明の骨形成治療デバイスは、骨誘導因子である骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸と、生体適合性を有し、多孔質ブロック体で構成された基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。本発明の骨形成治療デバイスは、基体の隣接する空孔同士の境界部の面積（平均）をA [μm^2] とし、前記空孔の最大断面積（平均）をB [μm^2] としたとき、B/Aが2～150なる関係を満足することを特徴とする。また、このような骨形成治療デバイスは、前記核酸を保持するベクターおよび血管形成誘導因子の一方または双方を含むのが好ましい。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願2002-356079
受付番号 50201854838
書類名 特許願
担当官 第五担当上席 0094
作成日 平成14年12月 9日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年12月 6日

次頁無

特願2002-356079

出願人履歴情報

識別番号 [000000527]

1. 変更年月日 2002年10月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都板橋区前野町2丁目36番9号
氏 名 ペンタックス株式会社

特願2002-356079

出願人履歴情報

識別番号 [501317906]

1. 変更年月日 2001年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住所 北海道札幌市南区真駒内緑町3丁目4-2-406
氏名 小野 一郎